

**Molekuláris biomarkerek vizsgálata oro-faringeális
daganatokban. Állatkísérletes és humán molekuláris
epidemiológiai vizsgálatok**

**Phd értekezés
tézisei**

Dr. Németh Árpád

Témavezető: Prof. Dr. Ember István

PTE ÁOK

Orvosi Népegészségtani Intézet

**Pécs
2006**

1. Bevezetés

A szájüregi (oro-faringeális) rák pontos meghatározása a szakirodalomban is vitatott. Szájüregi rákon a betegségek nemzetközi osztályozása (BNO) szerint az ajak, a szájüreg és a garat C00-C14 kódszámokkal megjelölt (rosszindulatú) daganatait értjük. Nem sorolják az oro-faringeális daganatok közé a tonsillák (C09), gége (C32), orrüreg (C30), sinusok (C31), valamint a nyálmirigyek (C07- C08) daganatait, amelyek a száj-garatüregi (oro-faringeális) daganatokkal együtt a fej-nyaki daganatok csoportját alkotják. A oro-faringeális daganatok kiemelt területét képzik az onkológiai kutatásoknak. Az aktualitást a daganatos megbetegedések abszolút értékben is nagy száma, és az is igazolja, hogy arányaiban is nő mind a férfiak, mind a nők körében. Magyarország európai viszonylatban is vezető helyen van a fej-nyaki daganatok okozta halálozási statisztikákban (16/100000 lakos, 28/100000 fű., 4,5/100000 nő halálozás), és az elmúlt években ez a tendencia nem változott. A magyarországi össz-daganatos halálozás 2004-ben 34456 fő volt (19500 fű, 14956 nő). A szájüregi daganatok száma 1975 és 1999 között 250%-kal nőtt, az elmúlt négy évben is újabb 15% az emelkedés, valamint 2004-ben 1690 fős halálozást jelentettek (KSH). A Nemzeti Rákregiszter szerint 2000 és 2005 között 18998 új oro-faringeális megbetegedést jelentettek Magyarországon.

Magyarországon az erőfeszítések ellenére a helyzet nem javul. A gyakori késői orvoshoz fordulás miatti megkésett felismerés korlátozza a hatékony beavatkozás esélyeit. Annak ellenére, hogy a fej-nyaki tumoros folyamatok java része laphámkarcinóma, szövettanilag jól osztályozható, kidolgozott sugár-, kemoterápiás és műtéti protokoll áll rendelkezésre, a kezelésbe vett betegek túlélése sem változott utóbbi évtizedek alatt (szájüregi rákok esetén ez kevesebb, mint 50%). Ezért a leghatékonyabbnak a különböző prevenciók szintek alkalmazása látszik, így a primer prevenció, ami a morbiditást és a következményes mortalitást is csökkenteni képes. Olyan hatékony, új molekuláris epidemiológiai biomarkerek alkalmazása tűnik célszerűnek, amelyek a morfológiai diagnózis előtt már pozitívak lehetnek és így a daganatkialakulás kockázatának jelzésére alkalmasak. Ilyenek a különböző kulcs onko/szuppresszor gének expressziójának változásai is.

A daganatok kialakulása szükségszerűen kiterjedt onko- és szuppresszor génkaskádót involvál, ezért célszerűnek tűnt a folyamatban résztvevő egyes kulcsszerepet játszó onko/szuppresszor gének vizsgálata korai behatároló biomarkerként a primer és a terciér prevencióban. Az általunk kiválasztott három gén, a *c-myc*, a *H-ras* és a *p53*, kulcsgén volt.

Először kémiai karcinogenezis iránt érzékeny egértörzsön (CBA/Ca,H-2^k) vizsgáltuk, állatkísérletes modellben a génexpresszió változásait. A korai, génszinten jelentkező tranziens vagy kontinuos génexpresszió változást okozó hatásokat 24, 48, 72-val a citosztatikumok alkalmazása után detektáltuk. A kezelést (citosztatikumok és az azokból álló protokollok) cervikális diszlokáció követte, majd a vizsgálandó szerveket eltávolítottuk, és RNS izolálást követően a mintát kemilumineszcensen jelölt génpróbákkal hibridizáltuk.

A génexpresszió változásokat mint a korai, premalignus elváltozások és az azt megelőző daganatképződési stádiumok biomarkereit vizsgáltuk. Kísérleteink végső célja az volt, hogy megpróbáljuk megítélni, használhatók-e az onko/szuppresszor gének expressziójának vizsgálatai egyes citosztatikumok okozta korai karcinogén hatás (expozíció és korai biológiai hatás) jelzésére és a folyamat követésére in vivo. Az irodalmi adatok és saját vizsgálataink szerint a tranziens génexpresszió változások alkalmasak állatkísérletben korai biomarkerként a terápiában alkalmazott protokollok potenciális karcinogén hatásának megítélésében, már akkor is amikor még daganatos elváltozás nem mutatható ki.

Az állatkísérletek tapasztalatainak birtokában humán vizsgálatokba kezdtünk, ahol kezeletlen és kezelt tumoros betegek szövetmintáiból, illetve a perifériás vérből határoztunk meg a génexpresszió változásokat. Korábban perifériás vérből humán vizsgálatokban diagnosztikus céllal végeztek génexpresszió meghatározásokat, jelen vizsgálat célja azonban az állatkísérletekben használhatónak bizonyult génexpresszió változások, mint korai behatároló biomarkerek vizsgálata volt.

Célunk volt az is, hogy megállapítsuk, hogy a klinikai gyakorlatban használt platina készítmények hozzájárulhatnak-e a magasabb recidíva számhoz, az esetlegesen kialakuló későbbi szekunder tumorok kialakulásához; a kezeletlen tumorszöveti génexpresszió hogyan viszonyul a kemoterápia és a besugárzás utáni állapotokhoz, miután a protokollok jelentős részében szereplő *Cisplatin* ismert IARC által klasszifikált 2/A osztályú karcinogén.

A fej-nyaki daganatok etiológiája, tumorgenezise, molekuláris epidemiológiája

A primer prevenció az elsődleges megelőzést, a szekunder prevenció a minél korábbi diagnózist és a szűrést jelenti, a tercier prevenció pedig a relapszus és a metasztázisok kialakulását hivatott megelőzni. A gondozás, a rehabilitáció és életvezetés is része a prevenciónak, s e folyamatot is jól lehet monitorozni molekuláris epidemiológiai biomarkerekkel. A primer és szekunder prevenció közötti terület azonban nem mindig határolható el élesen.

A klinikai adatok (recidíva szám) alapján felvetett kérdés a tercier prevenció kérdésköre, a posztoperatív recidívák elkerülését célozza. Véleményünk szerint az állatkísérletes eredmények hozzásegíthetnek, hogy egy többszintű, a prevencióban használható módszertant alakítsunk ki.

A fej-nyaki daganatok esetében a környezeti, életmódbeli hatások szerepének jelentősége megalapozott, de természetesen a genetikai tényezők talaján érvényesül. A dohányzás és alkoholfogyasztás szerepe régóta ismert tény a fej-nyaki daganatok etiológiájában és e két ágens *szinergizmus*a retrospektív elemzések alapján vezetett arra a következtetésre, hogy a kettő együttes hatása akár a rizikót akár tízszeresre is növelheti.

A szájüregi malignus folyamatok kialakulása is a többlépcsős karcinogenezis útján jön létre, ugyanugy mint a legtöbb daganatos folyamat multifaktoriális kóreredettel. Az első lépés során a karcinogén anyag és a DNS kölcsönhatása jön létre, mely genotoxikus elváltozást hozhat létre. A genotoxikus hatás akkor vezet daganatos folyamat folytatódásához, ha stabilizálódik a genomon létrejött változás. (Ha nem, epigenetikus hatásról beszélünk.) Ez az iniciáció. A promóció lényegesen lassabban megy végbe. Az iniciált és promoteált klón növekedése preblasztomatózist hozhat létre, mely ez esetben lehet nyálkahártya polipus vagy orális leukoplákia. A prekancerotikus állapot nem feltétlenül vezet malignus folyamat kialakulásához. A progressziót az invazív karcinóma, majd a metasztázisok kifejlődése követi. A tumorgenezis során nagyobb terület kerül karcinogén-expozíció alá (*"field of cancerization"*). Nagyszámú tumoros beteg biopsziás anyagaiban a szövettani vizsgálatok során a primer tumortól függetlenül voltak egyéb diszpláziás, hiperpláziás, hiperkeratotikus területek és in situ karcinóma is. A karcinogén expozíció nagy területen, irreverzibilisen prekondicionálja a találati terület szöveteit.

A korai biomarkerek alkalmasak lehetnek az expozíció-betegség folyamat monitorozására és egyes stádiumainak jellemzésére is, amennyiben molekuláris epidemiológiai biomarkereket használunk. Az expozíció és a betegség kialakulásának korai jeleit (korai biológiai hatás markerei) észlelhetjük genetikai/genomikai

szinten, még akkor, amikor az elváltozás fenotípusosan még nem látható. Ezért azonosíthatók a fokozottan veszélyeztetett, exponált csoportok. Nem kevésbé fontosak egyes betegségek prognózisában kulcsszerepet játszó egyéni érzékenység biomarkerei, hiszen csak az exponáltak egy részénél fejlődik ki daganat.

Azoknak a géneknek egy csoportját, melyek a daganat-kialakulás során aktiválódhatnak, onkogéneknek nevezték el. Kiderült, hogy ez nem homogén csoport, hanem különböző szerkezetű és funkciójú fehérjéket kódoló gének. Közös bennük, hogy normál körülmények között a sejtnövekedéssel, szignalizációval kapcsolatos szabályozó funkciókért felelősek, éppen ezért vezethetnek rendellenességeik kontrollálatlan osztódáshoz. A sejtben normálisan meglévő ilyen géneket proto-onkogéneknek nevezzük, ezek akkor válnak onkogénné ha ektópiásan aktiválódnak. A proto-onkogének aktivációja számos mechanizmussal történhet: pontmutáció, génamplifikáció, illetve génexpressziót szabályozó rendszer megváltozása kapcsán (kromoszómaátrendeződés, vírusintegráció). A daganat kialakulásában felelőssé tehető gének másik lényeges csoportját a tumorsuppresszor gének képviselik. Az abnormális növekedés, proliferáció és az apoptózis szabályozásán keresztül hatnak.

A molekuláris epidemiológia vagy makromolekulákat (DNS, RNS, kisebb részben fehérjék) vagy kismolekulájú metabolitokat tanulmányoz. Első lépés a sejtbe kerülő anyag sejtmagba jutása, majd a DNS-hez kapcsolódása kovalens kötéssel. A DNS adduktok vizsgálata pontos eredményt adhat az expozíció sejtszintű mértékéről már korán az expozíció után, de nem mindig vizsgálhatók, vagy csak bonyolult és költséges eljárással. Az adduktok vizsgálata abban az esetben is jó módszer, ha a környezeti karcinogén hatása ismert. Azok a változások, melyek a DNS-ben történnek detektálhatók a DNS izolálásával, majd mutációk, génamplifikációk, kromoszóma aberráció vizsgálatával, amelyek azután egyes géntermékek struktúráját, funkcióját megváltoztatják, vagy a génexpresszió mértékét befolyásolják.

Az RNS szintű vizsgálatok a gének expressziójának tanulmányozására szolgálnak és poszttranszkripcionális szinten alkalmasak kvantifikált kockázatbecslésre. Ezt különösen jól alátámasztja a DNS és RNS chip/array vizsgálatok daganatokban való alkalmazása, daganatspecifikus gén híján ugyanis a több ezer párhuzamos expressziós panel vizsgálata így, a primer és a terciér prevenció részeként, a bioinformatikai analízis révén a primer prevenció masszív tudományos megalapozottságát jelenti. Néhány reprezentatív génexpresszió vizsgálata, modellkísérletben hasonló információt ad részünkre. A talált génszintű elváltozások Kaplan-Meier túlélési görbékbe rendezhetőek, melyekben a koordinátákon a túlélők számát vonatkoztatjuk a túlélés idejéhez abban a tekintetben, hogy a vizsgált egyedek milyen jellegűek az általunk vizsgált marker tekintetében.

2. Célkitűzések

1. A klinikai adatok alapján látható volt, hogy a terápia részévé tett *Cisplatin*t is tartalmazó kezelés után a jobb preoperatív klinkai regresszió és operálhatóság mellett a követéses vizsgálatok magasabb recidíva számot mutattak. Célunk a magasabb recidíva szám háttérében álló lehetséges hatás vizsgálata volt, miután az eredeti *BVMM* (*Bleomycin*, *Vincristin*, *Metotrexat*, *Mitolactol*) protokoll használata során nem tapasztaltuk a fenti adatokat, tehát az egyetlen változás a *Mitolactol* helyettesítése volt *Cisplatin*nal.

A *CFu* (*Cisplatin*/5-*Fluoro-Uracil*) és *BVM* (*Bleomycin*/*Vincristin* /*Metotrexat*) kemoterápiás protokollok összehasonlító állatkísérletes vizsgálatát végeztük el első lépésben. A vizsgálatokat állatkísérletben, CBA/Ca H-2^k egértörzsben végeztük. Vizsgáltuk, hogy az Intézetünkben korábban kifejlesztett rövid-távú *in vivo*

tesztrendszer alkalmas-e a két protokoll hatásának összehasonlító vizsgálatára és a két séma milyen onko/szuppresszor génexpresszió változásokat okoz a *c-myc*, *Ha-ras* és a *p53* gén expressziójában rövidtávú vizsgálat során.

2. A protokollok egyik legfontosabb összetevője, a potenciálisan karcinogén (IARC 2/A) *Cisplatin* génexpresszióra gyakorolt hatásának vizsgálatát végeztük el monoterápiában, CBA/Ca H-2^k egértörzsön, el rövid-távú kísérletben az ismert mutagenitás tükrében. Célunk volt annak feltárása, hogy a *Cisplatin* önmagában is képes e hasonló génexpresszió változásokat indukálni *c-myc*, *Ha-ras* és a *p53* gén tekintetében.

3. A sztereoizomer *Transplatin* az irodalom egy része szerint hatásos szer, ezért kezdtük el génexpresszióra gyakorolt hatásának rövid-távú vizsgálatát. Számos más platina készítmény ismert. A *Cisplatin* igen hatékony rákellenes szer, feltétlenül a terápia része kell legyen platina készítmény a fej-nyaki laphám karcinómák kezelésének. Ez volt az ok, amiért e sztereoizomért megvizsgáltuk. Monoterápiában adagolva a szert CBA/Ca H-2^k egértörzsön detektáltuk a génexpresszióra gyakorolt hatást a *c-myc*, *Ha-ras* és a *p53* gén tekintetében.

4. Miután állatkísérletben mind a citosztatikus protokollok, mind a monoterápiás kezelés korai vizsgálatban megváltoztatta a vizsgált három gén expresszióját, megvizsgáltuk azokat kezelt és kezeletlen tumoros betegeken, kezelés előtti és utáni állapotokban. A cél az oro-faringeális tumoros beteganyagban a génexpressziós mintázat vizsgálata volt a három génnel összefüggésben, összevetve az irodalommal. Kérdés volt, hogy fenti állatkísérletek adatai alapján van e hatása a *Cisplatin* kiegészített citosztatikus terápiának a génexpresszióra és a kezeletlen tumorok expressziós mintázata hogy változik citosztatikus kezelés és a radioterápia hatására.

5. Előzőleg vizsgálták és bizonyították, hogy a fehérvérsejtekből történő génexpresszió meghatározás korai molekuláris epidemiológiai biomarkerként felhasználható (expozíció, korai biológiai hatás, lesodródott tumorsejtek). A három gén expresszióját vizsgáltuk perifériás fehérvérsejtekből, gégetumoros beteganyagban. A gégetumoros betegek vizsgálatára kevésbé invazív, új vizsgálómódszer használhatóságának felvetése volt a cél perifériás vérből, a veszélyeztetettség megállapítására a folyamatok követésére.

3. Anyag és módszer

RNS izolálás:

Előkészítés: A cervikális diszlokációval elölt állatokból származó szerveket fiziológiás sóoldattal mostuk, majd TRIZOL (GIBCO) oldatban homogenizáltuk (Ultra Turrax T25 homogenizátor 1 ml / 100 mg szövet).

Izolálás: (1 ml homogenizátumból kiindulva) a TRIZOL oldatban levő mintát szobahőn 5 percig inkubáltuk. 0,2 ml kloroform hozzáadása után a mintát összeráztuk (15 s), majd inkubálás történt szobahőn 2-3 percig. 12000 g-vel 15 percig 4 °C-on centrifugáltuk, majd 0,5 ml izopropil alkoholt adtunk a leszívott felülúszóhoz. Újabb inkubálás szobahőn 10 percig, majd a felülúszót eltávolítottuk. A csapadékot 70%-os etanollal mostuk, majd vortexelést követően centrifugálás következett 7500 g-vel 5 percig 4 °C-on. A mintát szárítottuk, majd

feloldottuk RN-áz mentes vízben. 10 perc inkubálás (55-60 °C-on) következett, majd a minta nukleinsav/fehérje arányát ellenőriztük fotometrálassal ($A_{260}/A_{280} > 1,8$).

Az RNS blottolása:

A blottert DEPCvízben történt egy órás áztatás után fülke alatt megszáritottuk. A membránt (Hybond+, Amersham) beáztattuk 5X SSC-be (DEPC-es) 15 percre. A membránt ráhelyeztük a blotterre (Hoefler) és bekapcsolt szívásnál összeszereltük a készüléket. 50 µl 20x SSC-t (DEPC-es) átszívattunk minden lyukon. A mintákat és a pozitív-negatív kontrollokat (50-50 µl) 20x SSC-t (DEPC-es) újra átszívattunk minden lyukon, majd szívás alatt szétszedtük a készüléket. A membrán áztatása következett 0,4 n NaOH-ban 2 percig, majd a membrán mosása DEPC-es 5x SSC-ben 1 percig és UV fixálása 10 percig.

DEPC-víz: Dietil-pirokarbonát 0,1%-os vizes oldata

20x SSC: 87,7 g NaCl, 44,0 g trinátrium-citrát-dihidrát 500 ml-re kiegészítve 2x desztillált vízzel, pH 7,0 (NaOH-val, vagy HCl-el beállítva)

Hibridizálás:

Próba jelölése: a próba koncentrációját beállítottuk a kitben levő vízzel 10 ng/µl-re, és denaturálás következett 100 °C-on 5 percig. Jégen 5 percig hűtöttük, majd centrifugálás 5 sec-ig. Azonos mennyiségű jelölő reagens hozzáadása után a jelölő reagenssel azonos mennyiségű glutaraldehyd oldatot adtunk hozzá. Rövid (1sec) vortexelést követően újra centrifugáltuk 5sec-ig, majd inkubáltuk 37 °C-on 10 percig (Amersham ECL Kit).

Hibridizálás (ATCC): A membránok előhibridizálása 15 percig 42 °C-on 0,125-0,25 ml / cm² mennyiségű, a kit-hez tartozó hibridizációs pufferben történt. A puffer leöntése után hozzáadtuk a próbát előmelegített pufferben. Inkubálás történt 42 °C-on egy éjszakán át, majd a 42 °C-ra melegített "primary wash pufferrel" mostuk 20 percig. Az előző mosást megismételtük. 2x SSC-vel mostuk szobahőn 5 percig. A detekciós oldat összemérése (detekciós komponensek 1:1 arányban)(0,125 ml / cm² membrán) után, engedték a membránra. Inkubálás szobahőn 1 percig és a felesleges detekciós oldat leitatása következett a membránról. Fóliába csomagoltuk és röntgen kazettába helyeztük. A röntgenfilm behelyezése után a filmet előhívtuk 15 perc elteltével. Új filmet helyeztünk be és előhívtuk 1 óra múlva. Az eredményt Quantiscan szoftver segítségével értékeltük ki.

Primary wash puffer: 360 g urea (karbamid), 4,0 g SDS, 25,0 ml 20x SSC, 1 literre kiegészítve 2x desztillált vízzel.

3/a. Állatkísérletes vizsgálatok I.-III.

Kísérleteinkhez 6-8 hetes, kémiai karcinogenezis iránt érzékeny CBA/Ca (H-2^k) egértörzset használtunk. A monoterápiás kísérletekben a platina készítmények testtömeg ekvivalens dózisát adagoltuk intraperitoneálisan (*Cisplatin*, *Transplatin* (0.66mg./1.ml. *i.p.*) egy alkalommal.

A protokollok esetében, hasonlóan a humán felhasználáshoz, testtömeg ekvivalens dózisokat használtunk a megfelelő időbeli elosztásban (*BVM* /*Bleomycin*, *Vincristin*, *Metotrexat*/ és *CFu* /*Cisplatin*, *5-Fluoro-Uracil*). A kontroll a megfelelő mennyiségű fiziológiás sóoldat volt. 24, 48, 72 órával a kezelés után cervikális diszlokációt követően feldolgoztuk a következő szerveket: tüsző, lép, vesék, máj, mezenterialis nyirokcsomók, tüdő és femorális csontvelő.

Alkalmazott protokollok (dózis és alkalmazási idő)

BVM protokoll

1. nap	Bleomycin	0.026mg
2. nap	Bleomycin	0.026mg
3. nap	Vincristine	0.01 mg
4. nap	Methotrexat	0.396mg
5. nap	Ca-leucovorine	0.04 mg

C-Fu protokoll

1. nap	Cisplatin	0.66mg
2. nap	Fluorouracil	6.6 mg
3. nap	Fluorouracil	6.6 mg
4. nap	Fluorouracil	6.6 mg

3/b. Humán vizsgálat I.

Négy betegcsoportot állítottunk fel. (PTE ÁOK Fogászati és Szájsebészeti Klinika beteganyaga; oro-faringeális laphám karcinóma esetei) Kontrollként a klinikán más jellegű megbetegedések gyanúja miatt (pl. Sjögren sy.) végzett kisnyálmirigy biopszia negatív eseteit használtuk 16 vizsgálati esetben. A kezeletlen tumoros csoport 25 páciensből állt (16 férfi, 9 nő). A BVMC kemoterápiával kezelték száma 13 volt (9 férfi, 4 nő). A citosztatikus terápiát két héttel követte a sebészi ellátás, a mintavétel a műtét alakalmával történt. Radioterápiát 10 beteg kapott (összdózis 40Gy) a vizsgálat előtt (7 férfi és 3nő).

A humán vizsgálat I. betegcsoportjai

1. csoport	Kezeletlen tumoros esetek (friss prex.)	16 fñ. 9 nő	áé.: 51.3±4.2 év
2. csoport	BVMC sémával kezelték	9 fñ. 4 nő	áé.: 54.2±5.4 év
3. csoport	Radioterápián átesett betegek	7 fñ. 3 nő	áé.: 56,1±3.8 év
4. csoport	Kontroll	10 fñ. 6 nő	áé: 50,5±4.4 év

A besugárzás után tizennégy nappal próbaexcízió történt. Minden esetben a tumor laphámkarcinómának bizonyult a szövettani vizsgálat során (HE festés). A mintavétel után azonnali fagyasztás történt mínusz 70 fokra a minta feldolgozásáig. Az RNS izolálása és az értékelés a fenti módon történt, hasonlóan az állatkísérletekhez.

3/c. Humán vizsgálat II.

Szövettanilag igazolt (HE festés) laphám karcinómában szenvedő páciensekből származó 20 ml vérminta került beküldésre gége-tumoros beteganyagból, melyek 45 páciensből származtak (30 fñ. és 15 nő, átlagéletkor: 56.2±6.2 év) (PTE ÁOK Fül-Orr-Gégészeti és Fej-nyak Sebészeti Klinika beteganyaga). Nevezettek nem részesültek még preoperatív kemoterápiában. A kontroll csoport 26 egészséges, nemdohányzó és nem alkoholizáló személyből származott. Fehérvérsejteket izoláltunk 0.89 % ammónium-klorid oldattal 500G-n centrifugálva 10 percen át a mintát. Ezután hasonlóan a fentiekhez génexpressziót vizsgáltunk. Vizsgálatunk

célja volt, hogy feltárjuk, hogy a perifériás vérből származó fehérvérsejtek gén expresszió vizsgálata mennyire érzékenyen jelzi ezeket a hatásokat és lehetséges-e a módszer biomarkerként történő alkalmazása.

A humán vizsgálat II. betegcsoportjai

1. csoport	Gége-tumoros betegek	30 ffi. 15 nő áé.: 56.2±6.2 év
2. csoport	Kontroll	19 ffi 7 nő áé.: 52.2±4,1 év

4. Eredmények

4/a. *Cisplatin-5Fluorouracil és Bleomycin-Vincristin-Metotrexát* kemoterápiás

protokollok összehasonlító vizsgálata állatkísérletben

Az első in vivo, „short-term” vizsgálat során a kemoterápiás protokollok korai hatását vizsgáltuk. A kemoterápiás sémák testtömeg ekvivalens dózist intraperitoneálisan adagoltuk. Cervikális diszlokációt követően a lép, máj, tüdő, vese, nyirokcsomók, timusz és csontvelő vizsgálata történt 24, 48 és 72 órával a kezelést követően. A nyirokcsomókban már 24 óra után szignifikáns génexpresszió emelkedést indukált a *CFu* protokoll, míg a *BVM* séma nem okozott definitív hatást, mely hatás 48 óra után sem kimutatható. A lépben hasonló változások voltak detektálhatók, „korai” hatás látható a *BVM* protokoll esetén is, de mérhető hatása a *CFu* sémának volt a *c-myc* és a *Ha-ras* gén esetében. A csontvelőben is hasonló hatást gyakoroltak a protokollok. CBA/Ca(H-2^k) egértörzseken a *CFu* (*Cisplatin-5Fluorouracil*) protokoll szignifikánsan magasabb génexpressziót indukált a lépben, a nyirokcsomókban és a csontvelőben, mint a platina készítmény mentes *BVM* (*Bleomycin-Vincristin-Metotrexát*) séma ($p < 0.05$). A legtöbb citosztatikus kezelés génexpresszió változásokat indukál, de jelen esetben a *Cisplatin* tartalmú protokoll szignifikáns eltérést okozott a *BVM* sémához képest. Indokolt volt tehát a *Cisplatin* szerepét felvetni az onko/szuppresszor gének expresszió fokozódásában, de végleges megállapításokhoz a hosszútávú vizsgálatok után juthatunk.

4/b. A *Cisplatin* génexpresszióra gyakorolt hatásának vizsgálata az ismert

mutagenitás tükrében

A testtömeg ekvivalens dózist (0,66 mg) intraperitoneálisan adagoltuk CBA/Ca(H-2^k) egerekben, majd cervikális diszlokációt követően szervenként (lép, máj, tüdő, vese, nyirokcsomók, timusz és csontvelő) mértük az onko/szuppresszor gének expresszió változását a kontrollhoz képest, 24, 48 és 72 órával a kezelés után. A *Cisplatin* igen rövid idő után változásokat indukált, úgy tűnik, hogy a protokolloknál kialakult hatásokért a *Cisplatin* is felelős lehet, nem zárva ki egyéb komponensek szerepét. Szignifikáns változást a csontvelő és a nyirokcsomók vizsgálata kapcsán láttunk. A csontvelőben a *Ha-ras* és a *p53* gén tekintetében láttunk emelkedést 24, 48 és 72 óra után is a kontrollhoz képest. A csontvelőben lévő heterogén sejtpopuláció miatt azonban ezek az eredmények óvatosan értékelhetők. A nyirokcsomók vizsgálata esetén a *Ha-ras* gén szignifikáns overexpresszióját láttuk 48 óra után. A *Cisplatin* jelentősen, szignifikánsan emelte az onkogének és szuppresszor gén expresszióját a nyirokcsomókban és a csontvelőben a *Ha-ras* és a *p53* gén tekintetében. ($p < 0,05$) Az

irodalomból ismert mutagenitás tükrében, felmerül a *Cisplatin* karcinogenitása, de ennek háttérében nem biztos, hogy kizárólag a *Cisplatin* mutagenitása áll, ezt „long-term” vizsgálatokkal lehet tisztázni.

4/c. A *Transplatin* génexpresszióra gyakorolt hatásának vizsgálata

Testtömeg ekvivalens *Transplatin* (0.66mg./1.ml.i.p.) intraperitoneális adagolása után 24, 48 és 72 órával vizsgáltuk a lépben, a májban, a tüdőben, a vesékben, a nyirokcsomókban, a tímuszban és a csontvelőben a génexpresszió változását a *Cisplatin* csoporthoz és a kontroll csoporthoz képest. A *Cisplatin*nal ellentétben a szintén mutagén *Transplatin* nem okozott szignifikáns változást a CBA/Ca(H-2^k) egértörzseken vizsgált három gén, a *Ha-ras*, a *c-myc* és a *p53* tekintetében. Egyik szervben sem láttuk azokat a hatásokat, melyet a *Cisplatin* esetében tapasztaltunk. Ellentétben a *Cisplatin*nal nem sikerült a *Transplatin* mutagenitása és a potenciális karcinogenitás (génexpresszió) között összefüggést találni ($p < 0,05$).

4/d. Vizsgálat kezelt és kezeletlen tumoros betegeken

Az ép szöveti kontrollhoz képest, minden csoportban emelkedett génexpressziós értékeket találtunk, mind a *c-myc*, mind a *Ha-ras* és a *p53* gén tekintetében is. A kezeletlen tumoros betegek esetében talált értékek megfelelnek a régóta ismert vizsgálati eredményeknek, így a daganatos megbetegedések által okozott onko/szuppresszor génexpresszió emelkedés itt is nyomon követhető biomarkerekkel is. Szignifikáns génexpresszió emelkedés volt látható *Ha-ras* és a *p53* gén esetében. A kemoterápia után látható génexpresszió változás szignifikáns volt az egészséges kontrollokhoz hasonlóan. Génexpresszió emelkedés volt a citosztatikus kezelés után a kezeletlen tumorszöveti értékekhez képest is, de szignifikáns emelkedés csak a *p53* tekintetében volt a kezeletlen tumorokhoz képest. A sugárterápia is megváltoztatta az onkogének és a szuppresszor gén aktivitását, bár a kezeletlen tumoros esetekehez képest némileg csökkentette a *p53* expresszióját. Eredményeink a vártak megfelelően alakultak a vizsgált gének expressziója a kezeletlen tumorszövethez képest. A sugárterápia után némileg csökkent a génexpresszió, de szignifikáns változást nem láttunk a kezeletlen tumorokhoz képest. Ezzel szemben a citosztatikus kezelés emelte a génexpressziót. ($p < 0,05$)

4/e. Génexpresszió, mint korai molekuláris epidemiológiai biomarker, vizsgálata perifériás fehérvérsejtekből

A perifériás vérminták a PTE ÁOK Fül-Orr-Gégészeti és Fej-nyak Sebészeti Klinika gége karcinóma miatt kezelt beteganyagából származtak. Minden beteg szövettanilag igazolt (HE festés prex. után) laphám karcinómában szenvedett. 20 ml vérminta került beküldésre, melyek 45 gége-tumoros páciensből származtak (30 fű. és 15 nő, átlagéletkor: $56,2 \pm 6,2$ év). A vizsgált páciensek nem részesültek még preoperatív kemoterápiában. A kontroll csoport 26 egészséges, nemdohányzó és nem alkoholizáló személyből származott. Látható, hogy szignifikáns génexpresszió emelkedés volt mindkét nemből az egészséges kontrollhoz képest. A daganatos megbetegedésben szenvedők, mind a nők, mind a férfiak esetében emelkedett expressziós értékeket találtunk. A nők esetén a génexpresszió emelkedés magasabbnak imponált a férfi betegek értékeinél is, de csak a *p53* esetén volt szignifikáns ez az eltérés. Minden vizsgált gén esetén a kontrollhoz képest szignifikáns volt a daganatos betegekből származó mintákban mért onko/szuppresszor gén expresszió ($p < 0,001$). A perifériás vérből nyerhető

fehérvérsejtek RNS-e jól alkalmazható génszintű vizsgálatokhoz tumoros betegekben, de a veszélyeztetettségi állapotok megítélésére is, tehát ideális kiindulási alap molekuláris epidemiológiai biomarker fejlesztéséhez.

5. Megbeszélés

A fej-nyaki daganatok magas előfordulási aránya, a magas letalitás, a relative rossz öt éves túlélés fordította figyelmünket a megelőzés ezen belül is a molekuláris epidemiológiai biomarkerek használata felé. Ezek mind a primer, mind a terciér prevencióban jól használhatók.

Másrésről az oro-faringeális tumoros megbetegedések statisztikai adatai és a platina készítmények használata után tapasztalt recidíva szám növekedés is irányította figyelmünket ebbe az irányba. Intézetünkben régóta folyik a kemoterápiás szerek mellékhatásainak, főleg karcinogén hatásának vizsgálata (*Cyclophosphamid*). A *Cisplatin* erősen mutagén, sőt egyes mutagenitási kísérletekben a *Cisplatin* egységként, kontrollként szerepel. A mutagenitás és a karcinogenitás közötti ismert 90 %-os koincidencia indított bennünket a platina készítmény és az azt tartalmazó protokoll vizsgálatára. Célunk olyan tesztrendszer összeállítása volt, melynek korai indikátora a kémiai karcinogén hatás bekövetkeztének, különösen annak figyelembe vételével, hogy ismert a hatás kezdete és intervalluma.

A tesztrendszer kialakítása során adott volt az Intézetünkben használt kémiai karcinogenezis iránt érzékeny CBA/Ca(H-2^k) egértörzs, melynek segítségével több kemoterápiás protokoll és más karcinogén-gyanús vegyület vizsgálata történt meg. Előzetes vizsgálataink alapján kijelöltük azokat a géneket, melyek kulcsfontosságúak az oro-faringeális daganatos megbetegedésekben és laphám eredetű karcinómákban. Három fontosabb gént határoztunk meg. Ezek a *Ha-ras*, *c-myc* és a *p53* voltak. A *Ha-ras* a sejtmembránhoz kapcsolódó G-fehérje, melynek pontmutációja után állandó proliferációs stimulust keletkezhet. A *c-myc* magi transzkripciós faktor. A *c-myc* transzlokációja után zavart szenved a transzkripció, így karcinómákban és limfómákban iniciatív faktor lehet. A *p53* pro-apoptotikus gén, mutációja és delécioja régóta ismert sokféle tumorban. Mint szuppresszor gén gátolja a daganat kialakulást a DNS reparáció segítségével, ugyanakkor nemcsak csökkent expressziója fontos, hanem az emelkedett is, mert másik oldalról pro-apoptotikus hatású.

•Először a különböző kemoterápiás protokollok génexpresszióra gyakorolt hatását vizsgáltuk meg CBA/Ca(H-2^k) egértörzsen. A klinikai gyakorlatban (PTE ÁOK Fogászati és Szájsebészeti Klinika) a *BVMM* (*Bleomycin*, *Vincristin*, *Metotrexat*, *Mitolactol*) protokollt használtuk sikerrel a daganatok terápiájában a megelőző években. A citosztatikumok klinikai alkalmazása az irodalmi javaslatok, és a saját terápiás tapasztalataink alapján történt. A mitolactol gyártása megszűnt, ezért egy másik szert kívántunk a séma részévé tenni, így adott és javasolt volt valamely platina készítmény használata. A klinikai felhasználás során az első időszakban primer klinikai regresszió tekintetében sikeresnek tűnő séma ellenére a posztoperatív recidíva szám negatív irányba változott, így *BVM* (*Bleomycin*, *Vincristin*, *Metotrexat*) és *CFu* (*Cisplatin* és *5-Fluoro-Uracil*) protokoll összehasonlítását kezdtük meg állatkísérletes modellben. Mindkettő elfogadott és a hazai kemoterápiás központok által használt és javasolt kombináció. Intézetünkben korábban számos kemoterápiás protokoll vizsgálatát végeztük el állatkísérletben, bizonyítva, hogy a korai génexpresszió és a későbbi karcinogén hatás között összefüggés van. Vizsgáltuk több, terápiában használt protokoll és citosztatikum génexpresszió emelkedést indukáló hatását (*CHOP*, *ABVD*, *COPP* és *Cyclophosphamid* stb.). A *Cyclophosphamid* esetében is bizonyítható volt a karcinogén hatás. Összehasonlították a klinikailag épnek tűnő és a környezeti, tumoros szövetek génexpressziós mintázatát is, más típusu daganatokban. Éppen történt daganateltávolítás után az ép szélből is sikerült igazolni a

magasabb expressziós értékeket, olyan esetekben, ahol a recidíva hajlam igazoltan nagyobb volt (field of cancerization). Rövidtávú kísérletünkben igazoltuk, hogy egyes szervekben a platina-származék tartalmú séma szignifikánsan emelte az onkogén expressziót a BVM protokollhoz képest.

- Az irodalmi adatok alapján ismert mutagenitás és a klinikai adatok alapján a *Cisplatin* (cis-diamminedichlorioplátin) állatkísérletes vizsgálatát hajtottuk végre. Igazoltuk, hogy a génexpressziós tesztrendszer már korán (24, 48 és 72 óra után) alkalmas a DNS-t ért direkt hatások vizsgálatára, amit gének overexpresszióval jeleznek, már rövid távon is. Az, hogy ez tranziens vagy kontinuus „follow up” tanulmányokkal tudjuk eldönteni, melyek jelenleg is folynak. A megemelkedett értékek hátterében a mutagén hatású *Cisplatin* állhat. Az eredmények és a *Cisplatin* ismert mutagenitásának tükrében felvetettük a *Cisplatin* szerepét a kemoterápia utáni szekunder daganatok karcinogenezisében. Miután az eddigi vizsgálatokban követhető volt az egyes citosztatikumok potenciális karcinogén hatása is génszinten, kézenfekvő volt a gyanított karcinogén és bizonyítottan mutagén *Cisplatin* monoterápiás hatásának vizsgálata. A *Cisplatin*nek direkt hatása van, a DNS szintézisét gátolja keresztkötések kialakításával a DNS szálai között. Nem fázis specifikus, hatását G₀ fázisban is kifejti. A *Cisplatin* mutagenitása jól ismert, a mutagenitás és karcinogenitás közötti incidenciája is arra indított bennünket, hogy megvizsgáljuk a *Cisplatin* ilyen irányú szerepét. Fontos, hogy a sejtbe jutott *Cisplatin* aktív formában hatását fejthesse. Ha a DNS adduktokon keresztül kialakulnak a kovalens kötések a szálak között, akkor az apoptotikus hatások összessége a (daganat)sejt pusztulását eredményezi. A *Cisplatin* hatására nemcsak apoptotikus hatások indulnak be, hanem egyes más, anti-apoptotikus gének működése fokozódik, és más apoptotikus hatású gének deregulációja is bekövetkezik.

- A következőkben feltérképeztük azokat a platina készítményeket, melyeket sikerrel használhatnánk a *Cisplatin* kiváltására. Ezen szerek (*Carboplatin*, *DACH-acetato-Pt*, *Oxaliplatin*, *Transplatin*) közül a szerkezeti analóg *Transplatin* tűnt ígéretesnek, mint a *Cisplatin*hoz legközelebb álló sztereoizomér. A *Transplatin* alkilező hatású szer, de nem rendelkezik olyan karcinogén hatással, mint a *Cisplatin* annak ellenére, hogy a *Transplatin* is mutagén. Azt is le kell szögezni azonban, hogy az irodalom jelentős része kérdésessé teszi a *Transplatin* hatékonyságát, mint kemoterápiás szerét, de egy kémiaiilag struktúrájában módosított, hatékony szer, fentiek ismeretében javasolható lenne a *Cisplatin* kiváltására.

- Humán vizsgálataink azt célozták, hogy felmérjük a régióból származó oro-faringeális tumoros betegek génexpressziós profilját a vizsgált három gén tekintetében és összevessük az irodalmi adatokkal. Ezután összehasonlítottuk ezt a profilt, a kezelést követő állapotokkal (citosztatikus- és sugárterápia). Célunk volt három onko/suppresszor gén expressziójának meghatározása volt fej-nyaki daganatos mintákon. A vizsgált gének a *c-myc*, *Ha-ras* és *p53* voltak. A tanulmányozott csoportok, az egészséges kontroll mellett, minden esetben szövettanilag igazolt (HE festés) oro-faringeális laphámrák esetei voltak. Vizsgáltunk kezeletlen tumoros eseteket, valamint citosztatikus és radioterápia utáni állapotokat. Az ép szöveti kontroll kisnyálmirigy biopszia hámszöveti részének negatív eseteiből származott. Összevetve az eredményeket látható volt, hogy az általunk vizsgált három gén jelentősen emelkedett a kezeletlen oro-faringeális tumorok eseteiben a kontrollhoz viszonyítva, tehát alkalmas molekuláris epidemiológiai biomarkerként az állapot rögzítésre. A kemoterápia utáni állapot (*BVMC/ Bleomycin*, *Vincristin*, *Metotrexát*, *Cisplatin*) emelkedett génexpressziót mutat még a kezeletlen állapotokhoz képest is. A sugárterápia után is fokozott onko/suppresszor gén aktivitást találtunk a kontrollokhoz képest, bár a kezeletlen tumorok adataihoz hasonlítva némileg csökkentette a *p53* expresszióját. Fentiek és monoterápiás kísérleteink ismeretében valószínűsíthető tehát, hogy a *Cisplatin* jelentős szereppel bír a

génexpresszió emelkedésében. Tisztázni kell továbbá a *Cisplatin* szerepét a fentiekben felvetett rövidtávú eredmények után hosszútávú kísérletben is. Génexpresszió emelkedés mindhárom gén tekintetében volt a citosztatikus kezelés után a kezeletlen tumorszöveti értékekhez képest is, de szignifikáns emelkedés csak a *p53* esetén volt a kezeletlen tumorokhoz képest. Más malignus folyamatokban (pl. leukémiák), a génexpresszió változást, mint molekuláris epidemiológiai biomarkert használva, a citosztatikus kezelés után onko/szuppresszor génexpresszió csökkenés látható, mely használható a „minimal residual disease” követésére, monitorozására. Tisztázandó kérdés, hogy a citosztatikus kezelés mely eleme felel a változásokért? A magasabb recidívaszám hátterének feltárásakor fontos, hogy azokat a terápiás elemeket, melyeket gyanúsítunk, ki kell zárni a kezelésekből, de ennek tisztázása további hosszú-távú vizsgálatok szükségesek.

•Megelőző vizsgálataink invazív vizsgálómódszere mellett érdeklődésünk egy kevésbé invazív, Intézetünkben sikerrel alkalmazott módszer felé fordult. Megvizsgáltuk gége-tumoros beteganyagon a perifériás vérből izolálható fehérvérsejtek RNS-ének kulcsgén expresszió változásait vizsgáltuk, mint molekuláris epidemiológiai biomarkert. Korábbi vizsgálatok során igazolódott, hogy a génexpressziós vizsgálatok molekuláris epidemiológiai biomarkerként való alkalmazhatósága. Látható előzetes kísérleteink alapján, hogy ezek a biomarkerek tumoros esetekben jól azonosíthatók a perifériás fehérvérsejtekből is. Ennek alapján indítottuk a vizsgálatsorozatot, amely a későbbiekben minimál invazív, magas kockázat meghatározására és primer prevencióra is alkalmas módszert hivatott kifejleszteni. A páciensek véréből fehérvérsejteket szeparáltunk, melyeket a tumorhoz képest egészséges környező szöveteknek tekintettünk („surrounding tissue”). Más vizsgálatokban láttuk, hogy kémiai karcinogén hatására emberben ezek az onko/szuppresszor gén expressziók szignifikánsan emelkedtek, nemcsak kialakult tumoros esetekben, de az azt megelőző állapotokban is. A magasabb onkogén aktiváció származhat a tumor-sejtekből, illetve a kémiai karcinogén által okozott expozíció következményeként is, miként azt korábbi állatkísérletekben és humán vizsgálatokban is bizonyítottuk. Ismereteink szerint ez volt az első vizsgálat, melynek célja gége-tumoros beteganyag fehérvérsejtjeinek ilyen jellegű vizsgálata volt.

6. Összefoglalás

A fent említett gének (*c-myc*, *Ha-ras* és *p53*) fontos szerepet játszanak általában a daganatok de a a fej-nyaki laphám eredetű tumorok korai fázisaiban is. Ismert a *Ha-ras*, *p53* és a *c-myc* szerepe az iniciációban és az anti-apoptotikus folyamatokban. Következésképp használatuk informatív lehet a terápia hatékonyságának megítélésében, a recidíva hajlam előrejelzésében. További tanulmányok kellenek a génstátusz, az individuális predikció és a karcinogén expozíció közötti pontos kapcsolat feltárásához. Ha sikerül itt is az összefüggést bizonyítani a korai génexpresszió emelkedés és a később kialakuló daganatok között („follow up” study), lehetséges a célcsoport azonosítása és a kockázatbecslés. A klinikai gyakorlatban a módszer alkalmas lehet a primer és terciér prevenció részeként, nem diagnosztikusan, a betegség kimenetelének vizsgálatára, a kezelés (kemoterápia) hatékonyságának és hatásainak nyomonkövetésére. Fontos feladat ezeket a módszereket a gyakorlatba átültetni, és lehetőségeit kihasználni a kezelésben és megelőzésben, az egyénre szabott kockázatbecslés kialakításában, kiegészítve az egyéni érzékenység módszereivel, valamint fontos szerepük lehet a terápia effektivitásának monitorozásában.

Vizsgálataink alapján igazoltuk, hogy szükséges és összeállítható olyan in vivo „short-term” tesztrendszer, mely más, irodalmilag igazolt génekkel kiegészítve alkalmas lehet kockázatbecslésre, primer prevencióra és a magas kockázatú páciensek kiemelésére. A molekuláris epidemiológiai biomarkerek a primer prevenció eszköztárába tartoznak, más, idetartozó módszerekkel együtt lehetőséget adnak a későbbiekben a gyakorló orvos számára (házi orvos, fogorvos) a veszélyeztetett populáció meghatározására és ezzel együtt a fatális megbetegedések megelőzésére. A klinikai gyakorlatban a módszer alkalmas lehet a tercier prevenció részeként is (nem diagnosztikusan) a betegség kimenetelének vizsgálatára, a kezelés (kemoterápia) hatékonyságának és más nem kívánt, esetleges karcinogén hatásának vizsgálatára.

7. Új megállapítások

1. A *CFu* (*Cisplatin/5-Fluoro-Uracil*) protokoll emelte az onko/szuppresszor gének expresszióját *BVM* (*Bleomycin/Vincristin/Metotrexát*) protokollal összehasonlítva állatkísérletben.
2. A *Cisplatin* szignifikánsan fokozta az onko/szuppresszor gének expresszióját „short-term” vizsgálat során a kontrollhoz képest.
3. A *Transplatin* nem emelte szignifikánsan a génexpressziót a kontrollhoz képest és szignifikánsan kevésbé emelte az onko/szuppresszor gének expresszióját a *Cisplatin*nal összehasonlítva.
4. Látható voltak malignus folyamatban szenvedő betegek emelkedett génexpressziós értékei az egészségesekhez képest. Az általunk használt tesztrendszerben az onko/szuppresszor gének expressziója jelezte az aktivitás fokozódását a *Cisplatin*nal kiegészített protokoll (*BVMC Bleomycin/Vincristin/Metotrexát/ Cisplatin*) használata esetén, még a kezeletlen tumoros mintákhoz képest is, míg a radioterápiában részesült betegeknél ez csökkent a kezeletlen tumoros betegek expressziós értékeihez képest.
5. A gége-tumoros betegek esetében perifériás vérből származó fehérvérsejtekből sikerült az onko/szuppresszor gének expresszióját, mint molekuláris epidemiológiai biomarkert alkalmazni, új minimál invazív módszerrel.
6. Az általunk használt onko/szuppresszor gének expresszió változásai alkalmasak lehetnek, mint korai biomarkerek a recidívák és a szekunder tumorok prevenciójában és a terápia hatékonyságának monitorozásában.

8. Publikációk:

Az értekezés témaköréhez közvetlenül kapcsolódó publikációk:

Folyóiratban megjelent eredeti közlemények:

- 1.Olasz L., **Németh Á.**, Nyárády Z.,Tornóczky T. és Királyfalvy L.: Kombinált cisplatin tartalmú kemoterápia randomizált vizsgálata a fej-nyaki régióban lévő planocelluláris rákok kezelésében Orvosi Hetilap 45:13-17 (2000)
2. **Németh Á.** Fej-nyaki daganatok molekuláris és prediktív epidemiológiája Orvostudományok 4:235-243(2001)
3. **Németh Á.**, Gyöngyi Z., Nádas E., Ember Á., Olasz L., Nyárády Z., Skapinecz J. and Ember I.: Effect of Cisplatin treatment on early activation of oncogenes in vivo. In Vivo 16:307-310 (2002) **imp. f.: 1,115**
- 4.**Németh Á.**, Nyárády Z., Ember Á., Beró T. és Rodler I. Szekunder tumorok preventiójának lehetőségei I. In vivo kezelés hatása onkogének korai aktivációjára. Egészségtudomány 47:91-100(2003)
- 5.**Á. Németh**, E. Nádas, Z. Gyöngyi, L. Olasz, Z. Nyárádi, Á. Ember, A. Kvarda, L. Bujdosó, I. Arany, I. Kiss, A. Csejtei and I. Ember: Early effects of different cytostatic protocols for head and neck cancer on oncogene activation in animal experiments. Anticancer Research 23:4831-4836 (2003) **imp. f.: 1.347**
- 6.**Németh Á.**, Nádas E., Beró A., Olasz L., Ember Á., Kvarda A., Bujdosó L., Arany I., Csejtei A., Faluhelyi Zs. and Ember I.: Early effects of Transplatin on oncogene activation in vivo Anticancer Research 24:3997-4002 (2004) **imp. f.: 1.347**
- 7.Olasz L., Nyárády Z., **Németh Á.**, Királyfalvi L. and Ember I.: Failure of alkylating agents in improving Induction chemotherapy of oropharyngeal squamous cell cancer Anticancer Research 24:2557-2562 (2004) **imp. f.: 1,347**
- 8.Olasz L., **Németh Á.**, Nyárády Z., Tornóczky T.and Királyfalvi L. Results and failures with or without Cisplatin containing induction chemotherapy in treatment of squamous cell carcinoma of head and neck. Cancer Detection Prevention 28(1):65-71(2004) **imp. f.: 1,408**
- 9.Ember I, **Németh Á.**, Varga Cs., Perjési P., Arany I., Fehér K., Németh K., Dombi Zs. and Kiss I.: Molecular epidemiologic markers: A new concept in the preventive medicine with special attention to the prevention of cancer Central European Journal of Occupational and Environmental Health 11: 3-15(2005)
10. **Németh Á.**, Szanyi I., Dombi Zs., Csontos Zs., Pytel J., Göbel Gy., Bauer M. and Ember Á.: Elevated gene expression in peripheral leukocytes as a biomarker of pharyngolaryngeal tumour patients Central European Journal of Occupational and Environmental Health 1:16-20(2005)
11. **Németh Á.**, Olasz L., Beró A., Pázsit E., Czákó Gy., Nowrasteh G., Varjas T., Dombi Zs. és Csontos Zs. : Gén expresszió vizsgálata fej-nyaki daganatos megbetegedések eseteiben Magyar Epidemiológia 4:111-116(2006)

Idézhető absztraktok:

- 1.Olasz L., Tóth B., **Németh Á.** and Tornóczky T.: Results and failures of preoperative BVMM chemotherapy and irradiation in advanced oral cancers. ISPO Symposium Cancer Detection Prevention 22(suppl.1)s-118(1998) **imp. f.: 1,408**

- 2.Olasz L., Nyárády Z., **Németh Á.**, Tornóczky T.: A randomized study of cisplatin-combined chemotherapy Protocol ISPO Symposium Geneva Cancer Detection Prevention 24 (Suppl-1)s-248(2000) **imp. f.: 1,408**
- 3.**Németh Á.**, Gyöngyi Z., Olasz L., Nyárády Z., Ember Á. and Ember I.: The effect of cisplatin on early oncogene activation in vivo Anticancer Research 21.No3A(2001) **imp.f.: 1,347**
- 4.Ember I., Faluhelyi Zs., Kiss I., Kvarda A., Bújdósó L., Ember Á., **Németh Á.**, Csejtei A. Nowrasteh G. and Varjas T.: Molecular epidemiological biomarkers of the primary prevention of cancer VII. International Conference of Anticancer Research, Corfu Anticancer Research Vol.24, Number 5D, September-Oktober pp:3479(2004) **imp. f.: 1,347**
- 5.**Németh Á.**, Nyárády Z., Olasz L., Ember Á. and Ember I.: Effects of Transplatin on oncogene activation in vivo VII. International Conference of Anticancer Research, Corfu Anticancer Research Vol.24, Number 5D, September-Oktober pp:3578(2004) **imp. f.: 1,347**
- 6.Olasz L., Kucsár Gy., Nyárády Z., Tornóczky T., **Németh Á.**, Kinczel G., Prantner I: results of neoadjuvant BVM chemotherapy + Culevit tablets for treatment of oropharyngeal cancer XVII. Congress of the European Assosiation for Cranio-maxillofacial Surgery Tours, France Journal of Cranio-maxillofacial Surgery, Vol 32, suppl.1.p229(2004)
7. **Németh Á.**, Varjas T., Beró A., Olasz L., Nyárády Z., Ember Á., Csontos Zs., Arany I., Pázsit E., Czakó Gy., Ember I., Dombi Zs.: A Transplatin hatása onkogének korai aktivációjára MMPET I. Nemzetközi Kongresszusa Magyar Epidemiológia Supplementum, 2:pp:67(2005)
- 8.**Németh Á.**, Varjas T., Beró A., Olasz L., Nyárády Z., Ember Á., Csontos Zs., Arany I., Pázsit E., Czakó Gy., Ember I., Dombi Zs.: A génexpresszió vizsgálata fej-nyaki daganatos megbetegedések eseteiben MMPET I. Nemzetközi Kongresszusa Magyar Epidemiológia Supplementum, 2:1pp:67(2005)
- 9.**Németh Á.**, Nádas E., Gyöngyi Z., Olasz L., Nyárády Z., Ember Á., Kvarda A., Bujdosó L., Arany I., Kiss I., Ember I.: Fej-nyaki daganatok terápiájában használt citosztatikus protokollok hatása onkogének korai aktivációjára állatkísérletben MMPET I. Nemzetközi Kongresszusa Magyar Epidemiológia Supplementum, 2:1pp:67(2005)
- 10.Szanyi I., **Németh Á.**, Dombi Zs., Csontos Zs., Göbel Gy., Ember Á.: Az emelkedett onkogén aktiváció, mint biomarker, vizsgálata leukocitákban faringolaringeális tumoros megbetegedésekben MMPET I. Nemzetközi Kongresszusa Magyar Epidemiológia Supplementum, 2:1pp:67(2005)
- 11.Ember I., Kiss I., Varga Cs., Varjas T., Nowrasteh G., Nádas E. and **Németh Á.**: Molecular epidemiological biomarkers in risk assessment of cancer The 10th World Congress on Advances in Oncology and 8th International Symposium on Molecular Medicine 13-15. October, 2005, Hersonissos, Crete, Greece International Journal of Molecular medicine 16:1(2005)

Kongresszusi előadások:

- 1.Olasz L., **Németh Á.**, Nyárády Z., Tornóczky T.: A Cisplatin randomizált klinikopathológiai vizsgálata Magyar Kemoterápiai Társaság XIV. Konferenciája (1999)
- 2.Olasz L., **Németh Á.**, Nyárády Z.: Randomized study of cisplatin containing chemotherapy protocol. Magyar Arc-, Állcsont és Szájsebészeti Társaság III. Nemzeti kongresszusa Hévíz(1999)

3. **Németh Á.**, Ember I., Olasz L., Nyárády Z.: Fej-nyaki daganatok molekuláris és prediktív epidemiológiája Magyar Arc-, Állcsont- és Szájsebészeti Társaság IV. Kongresszusa Debrecen(2000)
4. Olasz L., Nyárády Z., **Németh Á.**, Tornóczky T., Királyfalvy L.: Kombinált cisplatin tartalmú kemoterápia randomizált vizsgálata a fej-nyaki régióban lévő planocelluláris rákok kezelésében **Magyar Arc-, Állcsont és Szájsebészeti Társaság IV. Kongresszusa Debrecen (2000)**
5. **Németh Á.**, Nyárády Z., Olasz L., Ember Á., Ember I.: In vivo cisplatin kezelés hatása onko- és szuppresszorgének korai aktivációjára. **45/3(Suppl.-1)286MOT 24. Kongresszusa (2001)**
6. Nyárády Z., **Németh Á.**: Cisplatin tartalmú kemoterápiás protokoll hatása fej-nyaki daganatok molekuláris epidemiológiájára Fiatal Onkológusok Fóruma Pécs(2001)
7. **Németh Á.**, Gyöngyi Z., Olasz L., Nyárády Z., Ember Á. and I. Ember: The effect of Cisplatin on early oncogene activation in vivo (poster) International Conference on Apoptosis Athén Greece(2001)
8. Csejtey A., Faluhelyi Zs., Kiss I., Kvarda A., Bujdosó L., **Németh Á.** and Ember I.: Early detection of carcinogen exposures: an animal model using in vivo gene expressions as biomarkers ISAC XXII International Congress Montpellier France **(2004)**
9. Ember I., Kiss I., Varjas T., Nowrasteh G., Bujdosó L., Kvarda A., Faluhelyi Zs., Csejtey A., Ember Á., **Németh Á.**, Pázsit E., Czákó Gy. and Gergely P.: In vivo gene expression system is a good biomarker of chemopreventive agents 16th Pezcoller Symposium Trento Italy (2004)

Könyvfejezet:

1. **Németh Á.**, Ember Á., Bujdosó L., Kvarda A.: Fej-nyaki daganatok (152-167.o.) In: Daganatok és daganatmegelőző állapotok molekuláris epidemiológiája Szerk.: Ember I., Kiss I. **Medicina Könyvkiadó Rt. Budapest 2005**

Az értekezés témaköréhez közvetlenül nem kapcsolódó publikációk:

Folyóiratban megjelent eredeti közlemények:

1. Olasz L., **Németh Á.**, Tóth B. and Tóth T. Orocutan és pharyngocutan fistulák műtéti megoldása Orvosi Hetilap 44:2651-56(1996)
2. Olasz L., Kwashie F. and **Németh Á.** Closure of an oropharyngo-cutaneous fistula in an irradiated patient (a case report) International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery 28:364-65(1998) **imp. f.: 1,154**
3. Olasz L., **Németh Á.**, Kubatov M., Nyárády Z. Kiterjedt facialis defektusok kettős lebenyes rekonstrukciója Orvosi Hetilap 141:2079-83(2000)
4. Olasz L., **Németh Á.**, Nyárády Z. Surgical closures of oropharyngocutaneous fistulas Plastic and Reconstructive Surgery 106:577-82(2000) **imp. f.: 1,872**
5. Gyöngyi Z., Grama L., Nádas E., Sándor J., **Németh Á.**, Varga Cs., Kiss I. and Ember I.: Flow cytometric analysis of DMBA-induced early in vivo ras expression. In Vivo 16:323-326 (2002) **imp. f.: 1,115**
6. Sándor J., Szerencse P., Szűcs M., **Németh Á.**, Kiss I., Ember I.: Környezeti eredetű

daganatos megbetegedések területi halmozódásainak vizsgálata Magyar Onkológia 47:(2003)

- 7.Sándor J., **Németh Á.**, Kiss I., Kvarda A., Bujdosó L., Ember I.: Kistérségek halálozási viszonyainak változása Egészségtudomány 47:29-44(2003)
- 8.Kiss I., **Németh Á.**, Bogner B., Pajkos G., Orsós Zs., Sándor J., Csejtei A., Faluhelyi Zs., Rodler I. and Ember I.: Polymorphisms of glutathione-s-transferase and arylamine N acetyltransferase enzymes and susceptibility to colorectal cancer Anticancer Research 24:3965-3970 (2004) **imp. f.: 1,347**
- 9.Faluhelyi Zs., **Németh Á.**, Ródlér I., Csejtei A., Kvarda A. and Bujdosó L.: Gene expression changes in peripheral leukocytes of breast cancer patients as a result of CMF treatment Central European Journal of Occupational and Environmental Health 10:184-88(2004)

Kongresszusi előadások:

- 1.Olasz L., Herczegh P., **Németh Á.** : A reconstruction of pharyngocutaneous defect in a preoperatively irradiated patient. 12th International Conference on Oral and Maxillofacial Surgery Budapest 109(1995)
- 2.**Németh Á.**, Szabó Gy.: Az implantológia mindennapos problémái Magyar Arc-, Állcsont és Szájsebészeti Társaság Dunántúli (Pannon) Szekció Első Szimpóziuma (1998)
- 3.Szabó J., **Németh Á.**, Watts A. : Gyökértömő sealer-ek állatkísérletes vizsgálata Magyar Fogorvosok XV. "Árkövy" kongresszusa (1998)
- 4.Olasz L., **Németh Á.**, Nyárády Z.: Platysma musculocutaneous flap in the head and neck region. Magyar Arc-, Állcsont és Szájsebészeti Társaság III. Nemzeti kongresszusa (1999)
- 5.Kiss I., Bogner B., Csejtei A., Faluhelyi Zs., **Németh Á.**, Sándor J., Orsós Zs., Pajkos G. and Ember I.: Interaction between alleles of low penetrance genes in determining individual susceptibility to colorectal cancer 18th Meeting of the European Association for Cancer Research /EACR/ Innsbruck Austria (2004)
- 6.Ember Á., **Németh Á.**, Varga Cs., Faluhelyi Zs., Csejtei A., Iványi J., Kiss I., Ghodrattollah N., Fehér K., Kékes N., Dombi Zs., Arany I. and Ember I.: Investigation on the expression of onco/suppressor genes as predictive biomarkers for breast cancer patients VII. International Conference of Anticancer Research Corfu Greece (2004)Vol.24, Number 5D(2004) pp:3479 **imp. f.: 1,347**
- 7.Zs. Faluhelyi, Á. Ember, R. Schnabel, I. Ródlér, Gy. Czákó, E. Pázsit, **Á. Németh**, J.L. Iványi, Zs. Dombi, A. Kvarda, L. Bujdosó, A. Csejtei, A. Sebestyén, I. Boncz, I. Ember: CMF protocol has an effect on onco/suppressor gene expression - in vivo VII. International Conference of Anticancer Research Corfu, Greece October 25-30, 2004 Vol.24, Number 5D, September-Oktober 2004 pp:3483 **imp. f.: 1,347**
- 8.Kiss I., Orsós Zs., Csejtei A., Schnabel R., Faluhelyi Zs., Bogner B., Sándor J., **Németh Á.** and Ember I.: Allelic Polymorphisms of metabolizing enzymes modify the risk of colorectal cancer VII. International Conference of Anticancer Research, Corfu Anticancer Research Vol.24, Number 5D(2004) pp:3536 **imp. f.: 1,347**
- 9.Molnár T., Kiss I., Faluhelyi Zs., Csejtei A., Kvarda A., Bujdosó L., **Németh Á.**, Pázsit E. and Ember I.: Expression of onco/tumor suppressor genes in lung cancer patients VII. International Conference of Anticancer Research, Corfu Anticancer Research Vol.24, Number 5D(2004) pp:3536 **imp. f.: 1,347**
- 10.Nyárády Z., **Németh Á.**, Bán Á., Ember I. and Olasz L.: Relieving symptoms of xerostomia with oral pilocarpine (Salagen) during irradiation in head and neck cancer

VII. International Conference of Anticancer Research, Corfu Anticancer Research Vol.24, Number 5D(2004) pp:3536 **imp. f.: 1,347**

- 11.Schnabel R., Varga P., Kiss I., Ember I., Varga Cs., **Németh Á.** and Iványi J.:
Epidemiological investigation of patients with colorectal polyps VII. International
Conference of Anticancer Research Corfu Greece Anticancer Research Vol.24,
Number 5D(2004) pp:3623 **imp. f.: 1,347**
- 12.Nyárády Z., **Németh Á.**, Mukics A., Olasz L. Relieving symptoms of xerostomia withoral
pilocarpine (salagen) during irradiation in head and neck cancer XVII. Congress of the
European Assosiation for Cranio-maxillofacial Surgery Tours France J of Cranio-
maxillofacial Surgery 32:suppl.1pp230(2004)
- 14.Nyárády Z., **Németh Á.**, Bán Á., Ember I. and Olasz L.: Relieving symptoms of xerostomia
with oral pilocarpine (Salagen) during irradiation in Head and Neck Cancer
17th International Conference on Oral and Maxillofacial Surgery Vienna, Austria
(2005)
16. Nyárády Z., Mandel I., Orsi E., Róthy Á., **Németh Á.**, Olasz L.: Felszívódó implantátumok
traumatológiai alkalmazása arc-állcsontsebészetben Magyar Arc, Állcsont és Szájsebészeti
Társaság IX.Nemzeti Kongresszusa (2005) Hévíz
17. Nyárády Z., **Németh Á.**, Mukics A., Szentirmay M., Bán Á., Rónai A., Olasz L.:
Sugárterápia alatt kialakuló szájszárazság (xerostomia) tüneteinek enyhítése pilokarpin
tartalmú gyógyszerrel Magyar Arc, Állcsont és Szájsebészeti Társaság IX.Nemzeti
Kongresszusa (2005) Hévíz

In extenso közlemények száma: 19

Tézisekhez kapcsolódó közlemények impakt faktora: 6,564

Kumulatív impakt faktor: 12,052

Studies on molecular epidemiological biomarkers in oropharyngeal tumors. Animal experiments and molecular epidemiological studies.

PhD thesis

Árpád Németh MD

Supervisor: István Ember MD, PhD, DSc

Institute of Preventive Medicine
Faculty of Medicine
Pécs University of Sciences

Pécs, 2006

1. Introduction

The exact definition of the oral cancer (oro-pharyngeal tumors) is a controversial issue in the literature. According to the international classification of diseases (ICD) oral cancer includes the malignant tumors of the lip, oral cavity and pharynx, with code numbers C00-C14. Tumors of the tonsils (C09), larynx (C32), nasal cavity (C30), sinus (C31) and salivary glands (C07-08) do not belong to the oro-pharyngeal cancers. Oro-pharyngeal tumors form an extremely important area of cancer research. Their relevance is underlined by the frequent occurrence of cancer patients in terms of absolute numbers, and their increasing ratio within the total cancer cases, both among men and women. According to the oro-pharyngeal cancer statistics, Hungary is the leading country in Europe, with the mortality rate of 16/100.000 (28/100.000 for males, 4.5/100.000 for females), and this tendency has not been changed during the last years. The total number of cancer deaths in 2004 in Hungary was 33502 (18840 men and 14660 women). The number of oro-pharyngeal tumors increased by 250% between 1975 and 1999, and the increase was 15% in the last 4 years, resulting in 1690 death cases in 2004 (Central Statistical Office). Between 2000 and 2005 18998 new oro-pharyngeal cancer cases were reported to the National Cancer Registry in Hungary.

The situation in Hungary is not improving, in spite of all the efforts on the area of prevention. Chances of the successful intervention are limited, particularly by the late diagnosis because of the late contact with the physician. In spite of the fact that most of the head and neck tumors are squamous cell cancers which are histologically well characterizable, with well established radio-, chemotherapeutical and surgical protocols, survival of these patients has not been changed in the last decades.

Cancer formation necessarily involves a wide cascade of oncogenes and tumor suppressor genes. Studying some of the participating key-genes seems to be useful, concerning the problem of high number of postoperative recidives after good preoperative regression found at such patients. The chosen 3 genes (*c-myc*, *Ha-ras* and *p53*) are key genes in the development of head and neck tumors of squamous cell origin.

First we constructed an animal model by using a mouse strain (CBA/Ca, H-2^K) which is sensitive to chemical carcinogenesis. Three onco/suppressor genes were chosen, and the early effects (24, 48 and 72 hours), applicability and possibility of human applications were studied. The treatment (cytostatics and cytostatic protocols) was followed by cervical dislocation, the appropriate organs were removed, RNA was isolated and hybridized with chemiluminescently labeled probes. The extent and temporal changes of gene expressions were studied.

At the beginning gene expression changes were applied as early biomarkers. The final goal of our studies was to evaluate the applicability of measuring the expression of onco/suppressor genes for signaling and monitoring carcinogenic effects caused by cytostatic drugs, *in vivo*. The transient changes in gene expression, as early biomarker, can be useful in the detection of the potential carcinogenic effect of the chemotherapy, when the malignancy could not be detected.

After the animal experiments human studies were performed, where gene expression changes were determined from tissue samples and blood of treated and untreated cancer patients. Earlier the aim of the detection of gene expression was diagnostic, but we used them as biomarkers. Our goal was to evaluate whether the platinum compounds used in the clinical praxis contribute to the higher number of recidives and to the later formation of secondary tumors. We were also interested in the relation of gene expression in the untreated tissue

to the states after irradiation and chemotherapy, since *Cisplatin* is a known IARC 2A class carcinogenic compound.

The etiology, molecular biology and molecular epidemiology of head and neck tumors

Primary prevention means prevention, while secondary prevention is the equals to the early recognition and diagnosis, in a curable stage of the disease, if it is possible. Tertiary prevention tries to prevent the relapse in cured patients, so beside the nursing, rehabilitation and life support, its goal is the prevention of recidives and metastases. The border between primary and secondary prevention is not sharp. The question based on clinical data (number of recidives) is the problem of tertiary prevention, which intends to prevent the postoperative recidives. In my opinion, results of animal experiments may help in establishing a method, applicable for screening in the prevention. In case of the head and neck tumors the environmental-lifestyle conception seems to be reasonable, but naturally, it prevails on a genetic basis. Retrospective analysis of synergism between smoking and alcohol consumption has lead to the conclusion that the simultaneous effect of these two factors could result even in a tenfold risk increase.

Formation of oral malignancies can be attributed to several effects which are also carcinogenic if applied separately (multifactorial origin). This process, which leads to carcinogenic transformation is called **“multistage carcinogenesis”** (multistep cancer formation). The first step in this process is the interaction between the carcinogenic compound and the DNA, which results in a genotoxic change. The genotoxic effect leads to the malignant process, if the change in the genome is stabilized. If the effect is not genotoxic, it is called an epigenetic event. This is the initiation, the second step, the promotion is a much slower process. Proliferation of the initiated clone will result in a preblastomatosis, which, in this case can be a polyposis on the mucous membrane, or oral leukoplakia. The precarcinomatous status does not necessarily leads to the malignant process, it occurs only in the minority of the cases. The next step is the progression, the formation of the invasive carcinoma. During the carcinogenesis, a larger area gets into the carcinogenic exposure (**“field of cancerization”**). Histological studies on large number of biopsy samples from cancer patients found dysplastic, hyperplastic, hyperkeratotic areas and in situ carcinomas. The carcinogenic exposure irreversibly preconditions the target tissues on a large area.

Early biomarkers can be used to characterize certain, even molecular level stages of the exposure disease process. Early signs of exposure or disease formation can be detected on genetic level, when the phenotypical alteration is not visible yet. This can serve as a basis for the identification of high-risk, exposed groups. On the other side, biomarkers also play an important role in the assessment of the prognosis and individual susceptibility, since the disease does not develop in all of the exposed individuals.

A group of those genes which are activated during cancer formation are called oncogenes. This is not a homogenous group, but it includes genes encoding proteins with different structure and function. It is common, however, that in normal cells these proteins are responsible for the regulation of cell growth and proliferation, and this is why their dysfunction may lead to an uncontrolled cell proliferation. Such normally existing genes in the cells are called proto-oncogenes, while through their activation they become oncogenes. There are several possible mechanisms involved in the activation of proto-oncogenes: point mutation, gene amplification, and alterations in the gene expression regulation system (chromosome rearrangement, virus integration). The other

type of genes responsible for malignant tumor formation is the group of tumor suppressor genes. These genes control the abnormal growth, cell division and apoptotic mechanism.

The molecular epidemiology studies macromolecules (DNA, RNA, and to a certain extent, proteins) or smaller metabolites. The first step is the transport of the compound to the cell nucleus, and covalent binds to the DNA. Studying DNA adducts can provide very precise results on the cellular level of the exposure, but these markers can not always be studied, or only with very difficult and costly procedures. Determining DNA adducts is also a good method, when the effect of the environmental carcinogenic compound is known. Changes occurring in the DNA can be detected by DNA isolation and investigations of the point mutations, gene amplifications, chromosome aberrations, which errors can alter the structure or function of the gene products or influence the gene expression levels. In the course of studying the genetic material, several other alterations were also described. The gene expression level changes found can be arranged into survival curves, when the number of survivals and the time of survival is compared to the characteristics of the studied biomarkers.

2. Aims

1. Based on the analysis of clinical data, we found that after *Cisplatin* therapy, beside the better preoperative clinical regression and operability, the follow-up studies observed a higher number of recidives. Our goal was to study the possible effect behind this high number of recidives, since such data were not found during the application of the original *BVMM* (*Bleomycin, Vincristin, Metotrexat, Mitolactol*) protocol, and the only change was the replacement of *Mitolactol* with *Cisplatin*. We performed the comparative analysis of the *CFu* (*Cisplatin/5Fluoro-Uracil*) and *BVM* (*Bleomycin/Vincristin/Methotrexat*) protocols. The studies were carried out in animal experiments, on female CBA/Ca H-2^K mice, which animals are sensitive to the effects of chemical carcinogens. We studied whether the short-term in vivo test system, developed earlier in our institute, is applicable for the comparative analysis of the two protocols, and what kind of changes in the expression of *c-myc*, *Ha-ras* and *p53* genes were caused by these cytostatic protocols in the short-term study.

2. The above-mentioned experiments have led to the study of the potentially carcinogenic (IARC 2A) *Cisplatin* in monotherapy. Its gene expression level effect was studied in sensitive CBA/Ca H-2^K mice, in a short-term study, with respect to its known mutagenicity. Our goal was to explore whether the *Cisplatin* alone is able to induce significant alterations in the expression of *c-myc*, *Ha-ras* and *p53* genes.

3. The stereoisomer *Transplatin* is an effective agent, according to a certain part of the literature, and this is why we started the investigation of its short-term gene expression level effects. Beside other platinum compounds the *Cisplatin* is a very effective anti-cancer agent, so a platinum compound must certainly be the part of the therapy of head and neck squamous cell cancers. This was the reason why we studied its stereoisomeric form. We studied its effects on the expression of *c-myc*, *Ha-ras* and *p53* genes in monotherapy, in CBA/Ca H-2^K mice.

4. We studied in treated and untreated patients the applicability of the expression of the three genes (*c-myc*, *Ha-ras* and *p53*) in the prevention and prediction. The goal was to study patients with oro-pharyngeal tumors, and the comparison of gene expression patterns with data found in the literature. The main question was whether,

based on the above-mentioned animal experiments, the cytostatic therapy completed with *Cisplatin* has an effect on gene expression level.

5. Previous studies demonstrated the applicability of gene expression measurements in white blood cells as biomarkers. We studied the gene expressions in peripheral white blood cells in patients with laryngeal tumors. The goal was to examine the applicability of this less invasive, new investigation method of patients with laryngeal tumors, in order to assess their risk-status.

3. Materials and methods

RNA isolation:

Preparation: The animals were sacrificed by cervical dislocation, organs were removed, washed in physiological sodium chloride solution, and homogenized in TRIZOL (GIBCO) solution (1 ml/100 g tissue, Ultra-Thurrax T25 homogenizer).

Isolation: 1 ml TRIZOL homogenate was incubated at room temperature for 5 minutes. 0.2 ml chlorophorm was added and shaken (15 sec), which was followed by further 2-3 minutes of incubation at room temperature. After centrifugation at 12000 g for 15 minutes, 0.5 ml isopropyl alcohol was given to the supernatant. After 15 minutes incubation at room temperature the supernatant was removed, and the precipitate was washed with 70% ethanol. After vortexing, the material was centrifuged at 7500g for 5 minutes at 4 °C. The samples were dried and dissolved in RNase free water. This was followed by 10 minutes incubation (55-60 °C), and the purity of the sample was checked by photometry ($A_{260}/A_{280} > 1.8$).

RNA blotting:

The blotter was soaked in DEPC water for an hour, and then dried. The membrane (Hybond N+, Amersham) was soaked in 5xSSC (DEPC) solution for 15 minutes. The membrane was put on the blotter, which was then assembled at continuous vacuum. 50 µl 20xSSC (DEPC) was followed by the samples and positive and negative controls. The membranes were then soaked in 0.4 n NaOH solution for 2 minutes, followed by a wash in 5xSSC (DPC) and UV fixation for 10 minutes.

DEPC-water: 0.1% solution of diethyl-pyrocabonate.

20xSSC: 87.7 g NaOH, 44.00 g trisodium-citrate-dihydrate filled to 500 ml with bidistilled water, pH 7.0 (adjusted with NaOH or HCl)

Hybridization:

Probe labeling (Amersham ECL Kit): The probe concentration was adjusted to 10 ng/µl, and then denatured at 100 °C for 5 minutes, followed by immediate chilling on ice for 5 minutes and centrifugation for 5 seconds. Equivalent amount of labeling reagent was added, mixed, and then equivalent amount of glutaric aldehyde was added. After a short vortexing 5 seconds centrifugation and incubation at 37°C for 10 minutes was performed.

Hybridization (ATCC): Membranes were prehybridized at 42°C for 15 minutes in 0.125-0.25 ml/cm² buffer from the hybridization kit. After removal of this buffer the probe was added in prewarmed buffer. The membranes were incubated overnight at 42°C, then washed with prewarmed (42 °C) “primary wash buffer” for 20 minutes. Washing was repeated, then a rinse in 2xSSC was performed at room temperature for 5 minutes.

After composing the detection solution (components in 1:1 ratio 0.125 ml/cm²), it was pipetted onto the membranes, incubated for 1 minute, and the excess solution was removed. The membranes were packed into plastic wrap and put into X-ray cassettes. The X-ray films were removed and evaluated after 15 minutes. A next X-ray film was put into the cassette and removed after an hour. The results were analyzed with Quantiscan (Biosoft) software.

Primary wash buffer: 360 g urea, 4.0 g SDS, 25.0 ml 20xSSC, filled to 1 liter with bidistilled water.

3/a.. Animal experiments I-III.

In our experiments 6-8 week old female CBA/Ca H-2^K mice were used, which are sensitive to chemical carcinogenesis. 6-6 animals were used per group. In the monotherapy experiments body weight equivalent amounts of platinum compounds were given in the form of a single dose intraperitoneal treatment (*Cisplatin*, *Transplatin* 0.66 mg/1 ml).

In case of cytostatic protocols, similarly to the human application, body weight equivalent doses were used, at the appropriate temporal distribution (*BVM/Bleomycin*, *Vincristin*, *Methotrexat* and *CFu/Cisplatin*, *5-Fluoro-Uracil*): As control, the same amount of physiological sodium chloride solution was used. Twenty-four, 48 and 72 hours after the cervical dislocation the following organs were removed: thymus, spleen, kidney, liver, mesenterial lymph nodes, lung, femoral bone marrow.

Applied protocols (dose and time schedule)

BVM protocol

1. day	<i>Bleomycin</i>	0.026 mg
2. day	<i>Bleomycin</i>	0.026 mg
3. day	<i>Vincristin</i>	0.01 mg
4. day	<i>Methotrexat</i>	0.396 mg
5. day	<i>Ca-leucovorine</i>	0.04 mg

CFu protocol

1. day	<i>Cisplatin</i>	0.66 mg
2. day	<i>Fluorouracil</i>	0.6 mg
3. day	<i>Fluorouracil</i>	0.6 mg
4. day	<i>Fluorouracil</i>	0.6 mg

3/b. Human study I.

Four disease groups were constructed from the oro-pharyngeal squamous cell cancer patients from the Clinics of Dentistry and Oral Surgery. Negative small salivary gland biopsies from patients with suspected non cancer syndromes (e.g. Sjögren-sy.) were used for control purposes (16 samples). The untreated cancer group contained 25 patients (16 males and 9 females). 13 patients were treated with *BVMC* chemotherapy (9 males, 4 females).

The cytostatic therapy was followed by surgery after a 2-week period. The samples were taken at the surgical operation. 10 patients received radiotherapy (total dose 40 Gray) before the examination (7 males and 3 females).

Patient groups of the human study I.

Group 1	Untreated cancer cases 16 males, 9 females, age: 51.3 ± 4.2 y.
Group 2	Patients treated with BVMC scheme, 9 males, 4 females, age: 54.2 ± 5.4 y.
Group 3	Patients treated with radiotherapy, 7 males, 3 females, age: 56.1 ± 3.8 y.
Group 4	Control, 10 males, 5 females, age: 50.5 ± 4.4 y.

After the irradiation, a probe excision was made. The tumors were proved to be squamous cell cancers, in all of the cases by histological examination (HE staining). After sample taking, the samples were immediately refrigerated to -70°C and stored at this temperature until processing. The isolation of RNA, and the evaluation was done as described at the animal experiments.

3/c. Human study II.

Twenty ml blood sample was collected from 45 patients (30 males and 15 females, age: 56.2 ± 6.2 y.) with histologically (HE staining) proved laryngeal tumors (Clinics of Otorhinolaryngology and Head- and Neck Surgery). These patients did not receive chemotherapy. The control group was composed of 26 healthy, non-smoking and non alcoholic individuals. White blood cells were isolated by repeated centrifugation in 0.89% ammonium-chloride solution for 10 minutes. This was followed by gene expression measurements described above. The goal of our study was to evaluate how sensitively these gene expression alterations (from peripheral blood leukocytes) signal the possible carcinogenic effects, and to determine its applicability as a biomarker.

Groups of human study II.

Group 1	Patients with laryngeal tumors, 30 males, 15 females, age: 56.2 ± 6.2 y.
Group 2	Control, 19 males, 7 females, age: 52.2 ± 4.1 y.

4. Results

4/a. Comparative study of the *Cisplatin-5Fluorouracil* and *Bleomycin-Vincristin-Methotrexat (BVM)* protocols in animal experiments

Early effects of the chemotherapeutic protocols were studied in the in vivo short-term test system. The chemotherapeutic protocols were applied in body weight equivalent doses. After the cervical dislocation, spleen, thymus, liver, kidney, lung, lymph nodes and bone marrow were investigated, 24, 48 and 72 hours after the treatment. The *CFu* protocol induced a significant elevation in the gene expressions in the thymus, already 24 hours after the treatment, while the *BVM* scheme did not cause a definitive effect, and this effect was not seen at all after 48 hours. The spleen showed similar changes, “early” effect was seen also in case of *BVM* scheme, but

measurable effect was demonstrated for the *CFu* protocol in case of *c-myc* and *Ha-ras* genes. The protocols had similar effects on the bone marrow as well. In the sensitive CBA/Ca(H-2^k) mice the *CFu* (*Cisplatin-5Fluorouracil*) protocol induced significantly higher gene expression in the spleen, lymph nodes and bone marrow than the platinum compound-free *BVM* (*Bleomycin-Vincristin-Metotrexat*) scheme ($P < 0.05$).

Most of the cytostatic treatments induce gene expression changes, but in the present case the *Cisplatin* containing protocol caused a significant alteration if compared to the *BVM* scheme. So it was reasonable to suspect the role of *Cisplatin* in the elevated expression of onco/suppressor genes, but final conclusion can be only drawn after long-term studies.

4/b. Effect of *Cisplatin* on the gene expressions in the light of its known mutagenicity

Female CBA/Ca(H-2^k) mice, sensitive to chemical carcinogenesis were used for these experiments. The body weight equivalent amount (0.66 mg) of the compound was given intraperitoneally, and after the cervical dislocation the gene expressions were measured and compared to the controls (thymus, spleen, kidney, liver, mesenterial lymph nodes, lung, femoral bone marrow), 24, 48 and 72 hours after the treatment. The platinum compound induced alterations in our test system after a very short time, and *Cisplatin* seemed to be responsible for the effects found (however, we can not exclude the possible effect of the other components). The alterations were significant in case of the lymph nodes and bone marrow. In the bone marrow the expression of *Ha-ras* and *p53* genes were elevated at 24, 48 and 72 hours after the treatment. Because of the heterogeneous cell population in the bone marrow, these results can only be interpreted cautiously. In case of the lymph nodes the *Ha-ras* gene was significantly overexpressed after 48 hours. Our model proved to be applicable for the detection of the changes, even shortly after the treatment. *Cisplatin* significantly increased the expression of the oncogenes and suppressor gene in the lymph nodes and bone marrow (*Ha-ras* and *p53*, $p < 0.05$). In the light of its known mutagenicity, the carcinogenicity of *Cisplatin* can be suspected, but other than its mutagenicity could also be involved in the background of this effect.

4/c. Effects of *Transplatin* on gene expressions

After applying the body weight equivalent amount of *Transplatin* (0.66 mg/ml i.p.) gene expression changes were studied in the thymus, spleen, kidney, liver, mesenterial lymph nodes, lung, femoral bone marrow, and compared to the effects caused by *Cisplatin* and controls. In spite of *Cisplatin*, the *Transplatin* (which is also a mutagenic compound) did not cause significant changes in the expression of the studied 3 genes (*Ha-ras*, *c-myc*, *p53*), in the female CBA/Ca(H-2^k) mice. We have not seen the effects in any organs, found in the *Cisplatin* experiment. Unlike in case of *Cisplatin* we did not find an association between the mutagenicity and possible carcinogenicity of *Transplatin* ($p < 0.05$).

4/d. Studies on treated and untreated patients.

Compared to the control group with healthy tissues, we found elevated gene expression levels in all of the studied groups for all the 3 investigated genes (*c-myc*, *Ha-ras*, *p53*). The gene expression elevation in the untreated patients are agreement with clinical data, thus the gene expression elevations caused by the cancerous diseases can be followed and monitored (biomarker). Our test system was applicable for the detection of the

changes, significant gene expression elevation was demonstrated in case of *Ha-ras* and *p53* genes. The expression changes after the chemotherapy were also significant when compared to the healthy controls. The gene expression elevation was present also with regard to the values found in the untreated tumors. The radiotherapy also affected the activity of oncogenes and suppressor gene, but, when compared to untreated cases, it somewhat decreased the expression of the *p53* tumor suppressor gene. Based on our results the expression of the studied genes was in accordance with the expectations after the examination of the untreated tumor tissue. After the radiotherapy the gene expression somewhat decreased, but the changes were not significant compared to the untreated tumors. The cytostatic treatment resulted in an increased gene expression ($p < 0.05$).

4/e. Examination of gene expression, as early molecular eoidemiological biomarker, in peripheral white blood cell

All of the patients suffered from histologically verified (HE staining) squamous cell carcinoma. Twenty ml blood was drawn from 45 patients with laryngeal tumors (30 males, 15 females, age: 56.2 ± 6.2 y.) who did not receive preoperative chemotherapy. The control group was composed of 26 healthy non smoker and non alcoholic individuals. A significant elevation of the gene expressions was seen in both genders when compared to the controls. We found elevated gene expression values among both men and women with cancer. For women, these elevations seemed to be higher than in the male, but this was only significant for the *p53* gene. For all the studied genes, their expression was significantly higher among cancer patients than in the control group ($p < 0.001$).

5. Discussion

Statistical data on the oro-pharyngeal tumors and the increase in the number of recidives after treatment with platinum compounds paid our attention to this group of chemical compounds. In our institute we have a long history of studies on side effects of chemotherapeutical agents, focusing on their carcinogenicity (*Cyclophosphamide*). *Cisplatin* is so strongly mutagenic that in some mutagenicity experiments it serves as positive control. The existing 90% correlation between mutagenicity and carcinogenicity initiated our present studies on this platinum compound and scheme containing *Cisplatin*. Our goal was to construct a test system which could signal the chemical carcinogenic effects, particularly when the time of the exposure is known.

During the development of the test system, the experiments were based on the well-known animal model using a mouse strain sensitive to the chemical carcinogenesis (CBA/Ca(H-2^k)), which was previously used for investigations of several carcinogen-suspect chemicals. In the literature we searched for genes often mentioned concerning the oro-pharyngeal tumors and squamous cell carcinomas. We identified 3 important genes: *Ha-ras*, *c-myc* and *p53*. The *Ha-ras* gene encodes a membrane coupled G-protein. After a point mutation in this gene a continuous proliferative stimulus arises. *c-myc* is a nuclear transcription factor. After the translocation of the *c-myc* gene the transcription is disturbed, so it can be an initiator factor in carcinomas and lymphomas. The mutation and deletion of the pro-apoptotic *p53* gene are well known in several tumors. *p53*, as a suppressor gene inhibits tumor formation by helping the DNA repair. Not only its decreased expression can be important, but also its elevated transcription, since it has an anti-apoptotic effect as-well.

First we studied the effects of chemotherapeutic protocols on gene expressions in an animal model, with the help of a mouse strain sensitive to the chemical carcinogenesis (CBA/Ca(H-2^k)). Based on our clinical experience, our goal was to identify the cytostatic scheme in the background of the increased number of recidives. In the clinical practice (Clinics of Dentistry and Oral Surgery) the *BVMM* (*Bleomycin*, *Vincristin*, *Methotrexat*, *Mitolactol*) protocol was successfully used during the last years. The application of the cytostatics was based on literature suggestions and on our own therapeutical experience. The production of *Mitolactol* was ceased, and we tried to find an other alkylating agent for this cytostatic scheme. The suggested and logical alternative was the application of a platinum compound. During the clinical application, in spite of the successful early results on the area of primary clinical regression, both the number of recidives and the survival changed in an unfavorable direction, so we compared the *BVM* (*Bleomycin*, *Vincristin*, *Methotrexat*) and the *CFu* (*Cisplatin* and *5-Fluorouracil*) protocols in animal experiments. Both combinations are accepted and widely used in Hungarian chemotherapeutic centers. In our institute we previously studied the effects of three different cytostatic protocols, proving the applicability of the method, and also the effect of these cytostatic protocols on gene expressions. We studied the gene expression inducing effects of protocols used in human cancer therapy (*CHOP*, *ABVD*, *COPP*, *Cyclophosphamide*). In case of *Cyclophosphamide* we were able to prove the carcinogenic effect. In other type of tumor cases (brain tumors) we compared the gene expression patterns of the tumor tissue with the clinically intact surrounding areas. Our test system successfully detected the early effect of chemotherapeutic schemes also in these cases. In short-term experiments we proved that the platinum containing scheme significantly increased the expression of oncogenes in certain organs.

Based on clinical experience and literature data on its mutagenicity we decided to study the *Cisplatin* in animal experiments. We proved that the test system is applicable for the early (24, 48 and 72 hours after the treatment) detection of direct DNA level effects. We determined the level of gene expression for the studied 3 genes. In the background of the elevated values caused by the cytostatic protocols, the *Cisplatin* can probably be identified. In the light of these results, taken together with the known mutagenicity of the *Cisplatin* we brought up the role of *Cisplatin* in the carcinogenesis after cytostatic therapy, which may lead to recidives and formation of second primary tumors. Since in these studies the carcinogenic effect could be monitored on gene level, it was logical to study the suspected carcinogenic and proved mutagenic agent, *Cisplatin* alone in monotherapy. *Cisplatin* has a direct effect on the DNA inhibiting the DNA synthesis by making crosslinks between the DNA strands. *Cisplatin* is not phase-specific, it can exert its effect also in G₀ phase. The mutagenicity of *Cisplatin* is well known, and the correlation between mutagenicity and carcinogenicity motivated us to study the role of *Cisplatin*. It is important that *Cisplatin* can exert its effects in an active form within the cells. If the crosslinks between DNA strands are formed after DNA adduct formation, then the summary of the apoptotic effects will result in the death of the cancer cell. After *Cisplatin* treatment not only apoptotic signals are triggered, but also the transcription of other, anti-apoptotic genes is enhanced and deregulated.

As the next step, we identified those platinum compounds which could be used to successfully replace *Cisplatin*. Among these compounds, (*Carboplatin*, *DACH-acetato-Pt.*, *Oxiplatin*, *Transplatin*) *Transplatin* seemed to be promising, since it is a stereoisomeric form of *Cisplatin*. *Transplatin* is an alkylating agent, but in spite of its mutagenicity it lacks the gene expression enhancing effect of *Cisplatin*. However, role of epigenetic effects can not be excluded out either. Most of the related papers in the literature question the efficacy of

Transplatin as a chemotherapeutic agent, but probably its slightly modified form could be used to replace *Cisplatin*.

Our human studies focused on the description of gene expression profiles of oro-pharyngeal cancer patients, and on the comparison with the current literature. This profile was then compared with the status after chemotherapeutic or radiotherapeutic treatments. Our goal was the measurement of the expression of 3 onco/suppressor genes, *c-myc*, *Ha-ras* and *p53*. Besides the healthy controls we studied histologically verified (HE staining) cases of oro-pharyngeal squamous cell carcinomas. Groups were formed and studied from untreated cases and treated (chemotherapy and radiotherapy) cancer patients. The healthy tissue controls derived from negative cases of small salivary gland biopsies. When analyzing the results, we identified significant overexpression of the investigated 3 genes in untreated patients with oro-pharyngeal tumors, thus these biomarkers can be used for the description and definition of a given status of the patient. The status after the chemotherapy (*BVM/Bleomycin*, *Vincristin*, *Methotrexat*, *Cisplatin*) showed an increased gene expression even when compared to the expression data of the untreated patients. The radiotherapy also increased the activity of onco/suppressor genes compared to the healthy controls, but it slightly decreased the activity of the *p53* gene if compared with the results of the untreated patients. In view of this experiment and the results of the *Cisplatin* monotherapy study, we suppose that *Cisplatin* has an important role in the induction of gene overexpressions. However, after the results of the short-term studies, the role of *Cisplatin* must also be clarified in long-term studies. The gene expression elevations were present for all the three genes after the cytostatic treatment, when compared to the status preceding the therapy, but they only reached the level of significance in case of *p53* tumor suppressor gene. In case of other malignancies (e.g. leukemias) using gene expression changes as biomarkers, a decreased expression of onco/suppressor genes can be detected, which can be used to monitor the „minimal residual disease”. In our case the gene expression elevation could be matched to the increased number of tumor recidives. A further question to be answered is, that which element of the cytostatic treatment is responsible for these changes. At the exploration of the background of the high frequency of recidives, it is important to exclude the suspected therapeutical components, but for these tasks further long-term studies are required.

Besides these invasive types of studies our interest was directed to a less invasive method which developed in our institute and was already successfully applied. We investigated the peripheral white blood cells of a group of laryngeal tumor patients with our test system. Previous studies indicated the applicability of gene expressions as biomarkers. These earlier experiments demonstrated that these tumor markers (i.e. gene expressions) determined in peripheral white blood cells as well. Our present examinations were started to verify the usefulness of this minimal invasive method in human settings. The white blood cells from the blood of the patients were separated, and they were considered as healthy „surrounding tissue”. As demonstrated in previous studies, such changes show a significant elevation after carcinogenic treatment. In animal experiments we proved the role and applicability of gene expression alterations in relation to chemical carcinogenesis. Furthermore, we observed that gene expressions can be elevated even in the lack of manifest tumors in the exposed population. The elevated oncogene activation may derive from tumor cells, or it can be the consequence of the carcinogenic exposure. According to our best knowledge, this was the first study on patients with laryngeal tumors concerning gene expressions in leukocytes.

6. Summary

The mentioned genes (*Ha-ras*, *c-myc* and *p53*) play a crucial role in the genesis of head and neck tumors of squamous cell origin. The role of *Ha-ras*, *c-myc* and *p53* genes in the initiation and anti-apoptotic processes is known. Consequently, their application could be informative in the evaluation of therapeutical efficacy. Further “follow up” studies are needed to explore the connection between gene status, individual anamnesis and carcinogenic exposure, so the risk groups could be detected. If the correlation can be shown the method is likely to be applicable in the clinical practice, it can be involved, as a part of tertiary prevention in the assessment of disease outcome in the evaluation of the efficacy of the therapy.

Our examinations proved, that it is necessary to form a “short –term” testing system, completed with other genes, which is able to estimate risks and suitable for primary prevention. The application of molecular epidemiological biomarkers, with other methods, is a part of the primary prevention and gives possibility for physicians and dentists to detect the risk population and prevent fatal diseases. This method can be useful as a part of the tertiary prevention, in clinical trials, to measure the efficacy of the chemotherapy and its side effects.

7. New scientific results

1. The *CFu* (*Cisplatin*, *5-Fluorouracil*) protocol significantly elevated the expression of onco/suppressor genes when compared to the *BVM* (*Bleomycin*, *Vincristin*, *Methotrexat*) protocol.
2. *Cisplatin* significantly increased the expression of onco/suppressor genes in short-term studies compared to the control group.
3. *Transplatin* did not cause a significant elevation of gene expressions with regard the controls and resulted in a significantly smaller elevation when compared to the *Cisplatin* therapy.
4. Gene expression values of the cancer patients were compared to healthy individuals. In our test system the expression of onco/suppressor genes signaled an enhanced activity in case the protocol was extended with *Cisplatin* (*BVMC* *Bleomycin*, *Vincristin*, *Methotrexat*, *Cisplatin*), even when compared to the untreated patients, while in patients treated with only radiotherapy this was decreased with regard to the samples of untreated patients.
5. In case of patients with laryngeal tumors the application of gene expression measurements from peripheral leukocytes as a new minimal invasive method, biomarkers were successful.
6. The applicability of the studied gene expression alterations in the prevention of secondary tumors and in the monitoring of therapeutical efficacy was demonstrated.